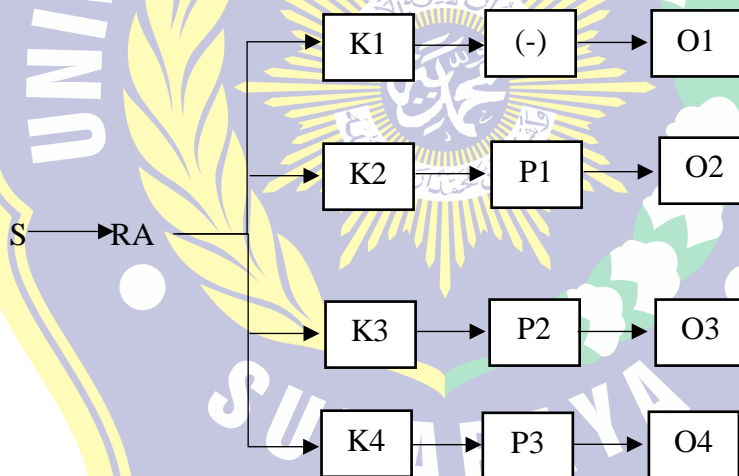


BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Sebelumnya telah banyak penelitian yang membuktikan terkait kandungan dan manfaat dari *Smalanthus sonchifolius* sebagai terapi antihiperqlikemia. Untuk tahap selanjutnya ialah melakukan true eksperimental pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi streptozotocin yang dapat merusak sel beta pankreas dan meningkatkan kadar glukosa darah untuk mengetahui dosis yang tepat dan mekanisme dari *Smalanthus sonchifolius* terhadap penurunan kadar glukosa darah pada hewan coba dengan teknik “*Randomized pre and post test control group design*” dan memberi perlakuan pada mencit yang telah dibuat hiperqlikemi dan diberikan terapi oral ekstrak *Smalanthus sonchifolius* dan dipantau kadar glukosanya menggunakan glucometer sehari ke tujuh paska pemberian ekstrak *Smalanthus sonchifolius* hingga didapatkan kadar glukoda yang diharapkan.



Keterangan:

S :Mencit (*Mus Musculus*) jantan

RA : Randomisasi

K1 : Kelompok kontrol

K2 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Smalanthus sonchifolius* 1

K3 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Smalanthus sonchifolius* 2

K4 : Kelompok perlakuan pemberian ekstrak *Smalanthus sonchifolius* 3

P1 : Kelompok pemberian ekstrak *Smalanthus sonchifolius* dosis 200mg

- P2 : Kelompok pemberian ekstrak smalanthus sonchifolius dosis 300mg
P3 : Kelompok pemberian ekstrak smalanthus sonchifolius dosis 500mg
O1 : Pengamatan pada kelompok control pada hari ke 7
O2 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 1 pada hari ke 7
O3 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 2 pada hari ke 7
O4 : Pengamatan pada kelompok perlakuan 3 pada hari ke 7

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit yang dipelihara dalam kandang yang sama di ruangan sama serta diberi perlakuan yang sama di laboratorium Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus Musculus*) yang berkisar sekitar usia 6 minggu hingga 21 minggu dengan kisaran berat 20 hingga 30 gram. Pemilihan mencit jantan karena struktus tubuhnya mirip dengan manusia dan perawatan yang cenderung lebih mudah. Mencit betina tidak digunakan karena pertimbangan adanya factor hormonal (estrogen dan progesterone) yang kemungkinan dapat memengaruhi eksperimen ini.

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- 1) Mencit berusia sekitar 6 minggu hingga 21 minggu, dengan berat kisaran 20 – 30 gram
- 2) Mencit (*Mus Musculus*) jantan

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Mencit betina
- 2) Berat lebih dari atau kurang dari kisaran berat yang ditentukan
- 3) Mencit yang mati

4.2.3 Besar Sampel

Pada penelitian eksperimental sebenarnya tidak ada batas minimal dalam menentukan besaran jumlah sampel, berhubung penelian ini menggunakan uji ANOVA dalam pengolahan dan analisis data maka memiliki ketentuan rumus sebagai berikut:

$$(t - 1) (r - 1) > 15$$

t = Banyaknya kelompok perlakuan

r = Banyaknya replikasi

Diketahui:

$$t = 4$$

$$r = ?$$

$$(t - 1) (r - 1) > 15$$

$$(4 - 1) (r - 1) > 15$$

$$(3) (r - 1) > 15$$

$$(r - 1) > 15/3$$

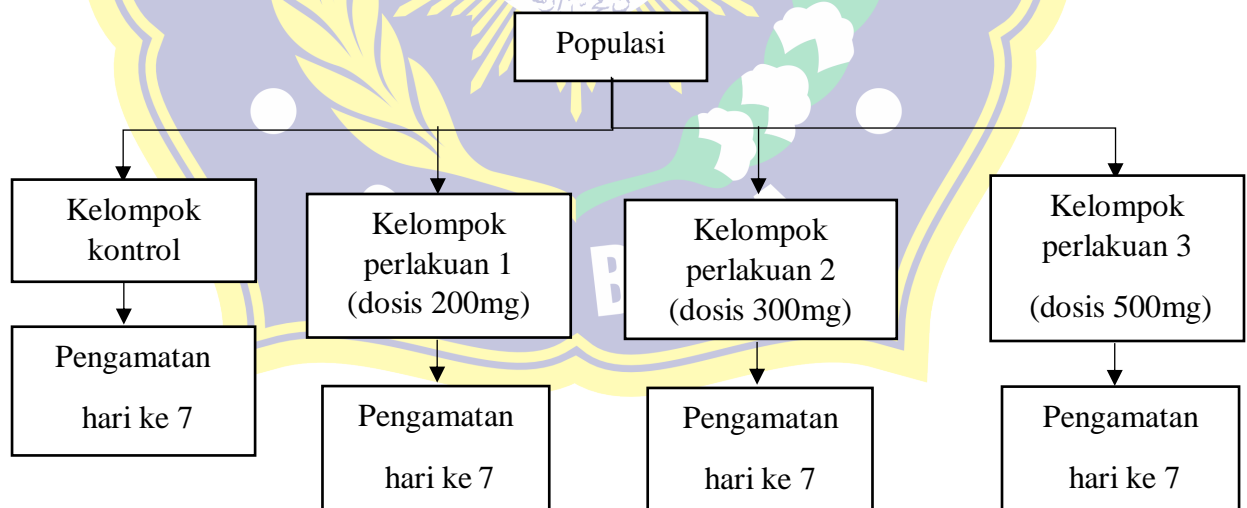
$$(r - 1) > 5$$

$$r > 5 + 1$$

$$= r > 6$$

Jadi dari hasil penghitungan diatas didapatkan hasil $r > 6$ sehingga nilai r (jumlah sampel yang digunakan pada setiap kelompok) adalah 7. Pada penelitian ini dilakukan empat kelompok perlakuan sehingga total sampel yang digunakan sebesar 28 ekor mencit.

4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel



- 1) Kelompokkan secara random populasi mencit (*Mus Musculus*) menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang terdiri dari 7 ekor mencit pada tiap kelompoknya

- 2) Setelah itu dilakukan karantina 1 hari guna mengontrol pola makan pada tikus agar hasil pengukuran gula darah puasa tidak mengalami bias
- 3) Setelah itu lakukan induksi streptozotocin melalui intraperitoneal dengan dosis rendah 40mg/KgBB per hari selama lima hari berturut-turut. Lakukan pre test glukosa darah dengan cara mengambil darah kapiler tikus pada ekornya dan ukur menggunakan glucometer amati kadar glukosa darah dihari keenam, diharapkan terjadi peningkatan glukosa darah
- 4) Setelah hasil kadar glukosa darah mencit mengalami hiperglikemia, bagi populasi mencit menjadi empat kelompok, satu kelompok control yang tidak diberikan terapi apapun dan tiga kelompok perlakuan yang diberikan terapi menggunakan ekstrak smalanthus sonchifolius dengan masing-masing dosis 200mg, 300mg, dan 500mg via oral selama tujuh hari
- 5) Dan amati hingga hari ke 7 pasca pemberian ekstrak untuk melihat dosis yang efektif dalam penurunan kadar glukosa darah pada tikus tersebut.

4.3 Klasifikasi Variabel

4.3.1 Variabel Dependent (Tergantung)

1. Penurunan kadar glukosa darah
2. Peningkatan kadar glukosa darah

4.3.2 Variabel Independent (Bebas)

1. Ekstrak smalanthus sonchifolius dosis 200mg/kgBB
2. Ekstrak smalanthus sonchifolius dosis 300mg/kgBB
3. Ekstrak smalanthus sonchifolius dosis 500mg/kgBB

4.3.3 Variabel lain

- 1) Variabel terkontrol : Pakan, air minum, cara pemeliharaan, kebersihan kandang, waktu perlakuan, metode pemeriksaan, cara pemberian dan dosis pada tikus
- 2) Variabel tak terkontrol : stress, hormonal, penyakit hati dan pancreas, kualitas ekstrak smalanthus sonchifolius, genetik dan fisiologis mencit, dan kualitas streptozotocin

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4.1: Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Hasil Ukur	Skala Data
Ekstrak smalanthus sonchifolius	Kandungan senyawa flavonoid, fruktooligosakarida dan fenol yang diperoleh melalui proses pengekstrakkan smalanthus sonchifolius	Penilaian dilakukan secara kuantitatif (mg) dari hasil proses pengekstrakkan	Milligram (Mg)	Nominal
Kadar glukosa darah	Mencit (<i>Mus Musculus</i>) jantan yang diinduksi streptozotocin sehingga mengalami kerusakan sel beta pankreas selanjutnya diberikan ekstrak smalanthus sonchifolius via oral dan diamati sehari ke 7	Penilaian dilakukan secara kuantitatif visual dengan pengambilan sampel darah kapiler yang diinsisi melalui ekor tikus dan diukur menggunakan glokometer	Intoleransi glukosa dapat dilihat apabila kadar glukosa >140mg/dl dalam waktu 1 jam pasca pemberian glukosa	Rasio (numeri c)

4.4 Instrumen dan Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Pakan standar untuk mencit (*mus musculus*), ekstraksi dari smalanthus sonchifolius, larutan dapat sitrat 0.05M Ph 4.3-4.5, larutan dekstrose 10%, larutan NaCl 0,9%, streptozotocin, dan mencit jantan (*Mus Musculus*) yang berusia sekitar 6 minggu hingga 21 minggu, dengan berat kisaran 20 – 30 gram

4.4.2 Instrumen Penelitian

Kandang tikus coba berukuran 30 x 40 x 40 cm, tempat pakan dan tabung minum untuk mencit coba, satu set alat pengukur kadar glukosa darah (glucometer, chip, dan strip), timbangan, tinta dan kertas sebagai penanda pada tikus coba, tabung 15ml untuk membuat larutan streptozotocin dengan larutan depar sitrat, spuit 1 ml untuk menginduksikan streptozotocin yang telah dilarutkan dengan larutan buffer sitrat 0,05 M pH 4,5 secara intraperitoneal, pisau atau gunting untuk membuat sayatan kecil pada ekor mencit coba guna pengambilan sampel darah perifer.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

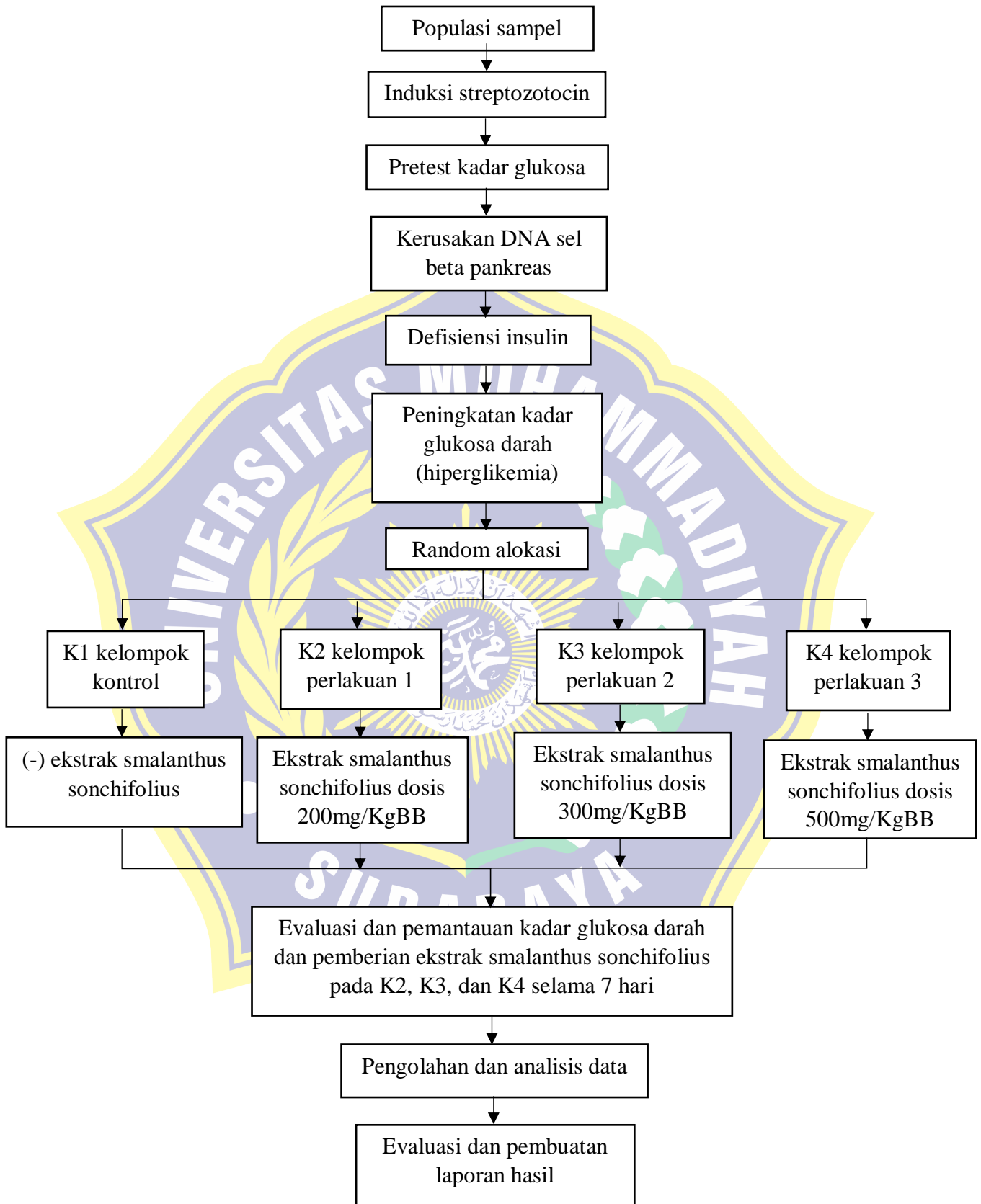
1. Perlakuan, perawatan, pemantauan, dan penelitian terhadap tikus coba dilakukan di Laboratorium Pusat Veteriner Farma (PUSVETMA) Surabaya pada bulan Februari 2020
2. Pembuatan ekstrak *Smilax sonchifolius* dilakukan di Laboratorium Balai Materia Medika, Malang.

4.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

1. Dipilih mencit jantan (*Mus Musculus*) 28 ekor dengan kriteria usia dan berat badan antara 6-21 minggu dan kisaran berat badan 20-30gram. Kemudian dibagi kedalam 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus
 - 1) Kelompok kontrol
 - 2) Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian ekstrak *Smilax sonchifolius* dosis 200mg/KgBB
 - 3) Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian ekstrak *Smilax sonchifolius* dosis 300mg/KgBB
 - 4) Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian ekstrak *Smilax sonchifolius* dosis 500mg/KgBB
2. Setelah itu dilakukan karantina 1 hari guna mengontrol pola makan pada tikus agar hasil pengukuran gula darah puasa tidak mengalami bias

3. Lakukan induksi larutan streptozotocin dengan dosis 40mg/KgBB yang dilarutkan dengan asam sitrat 0.05M pH 4,5 menggunakan spuit 1ml secara intraperitoneal selama lima hari berturut-turut
4. Cek kadar glukosa darah pada tikus dihari kedelapan pasca induksi streptozotocin untuk melihat kadar glukosa darah 2 jam setelah makan. Hasil yang diharapkan terdapat peningkatan kadar glukosa darah
5. Perlakuan induksi streptozotocin diberikan ke semua kelompok populasi mencit
6. Setelah terjadi peningkatan kadar glukosa darah pada semua kelompok populasi tikus, bagi tikus kedalam 4 kelompok. Pada kelompok 1 yaitu kelompok control tidak diberikan perlakuan terapi sedangkan pada 3 kelompok lainnya diberikan perlakuan terapi menggunakan ekstrak *Smilax sonchifolius* dengan masing-masing dosis 200mg/kgBB, 300mg/kgBB dan 500mg/kgBB secara oral.
7. Pemberian ekstrak *Smilax sonchifolius* diberikan setiap hari selama 7 hari kedepan
8. Perlakuan mencit pada tiap kelompok diberikan perlakuan yang sama
9. Untuk mengetahui keefektifan penurunan glukosa darah terhadap dosis yang diberikan pada masing-masing kelompok perlu dilakukan pengecekan kadar glukosa darah 2 jam setelah makan dihari ke 7 hari pasca pemberian ekstrak

4.7 Bagan Alur Penelitian



4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data

4.8.1 Cara Pengolahan Data

Dari hasil data pengamatan kadar glukosa darah pada tiap-tiap kelompok yang terkumpul dilakukan coding, editing, transfer atau entry, dan cleaning data. Langkah berikutnya dilakukan pengelompokan data berdasarkan variabel penelitian dan disajikan dalam bentuk tabel distribusi frekuensi, data silang, dan atau data grafik.

4.8.2 Analisis Data

4.8.2.1 Uji Beda/ Komparatif

Sebelum dilakukan uji beda, kadar glukosa darah pada mencit diuji normalitas terlebih dahulu dengan Saphiro-Wilk dan uji homogenitas dengan uji Varians Levene's (nilai kemaknaan $p > 0,05$). Apabila data telah normal dan telah homogen, uji beda yang dilakukan pada setiap kelompok perlakuan dapat dilakukan menggunakan uji varians satu arah (one way ANOVA) dengan tingkat kesalahan 5% (nilai kemaknaan $p < 0,05$). Jika terjadi perbedaan yang bermakna maka digunakan uji (analisa post hoc) LSD (Least Significant Difference) uji beda nyata terkecil. Apabila data tidak normal dan tidak homogen maka uji yang digunakan Kruskal-Wallis, dan apabila terdapat perbedaan yang bermakna uji yang digunakan (analisa post hoc) Mann-Whitney.

